



TITLE:

Time-dependent structural alteration of rituximab analyzed by LC/TOF-MS after a systemic administration to rats(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Otani, Yuki

CITATION:

Otani, Yuki. Time-dependent structural alteration of rituximab analyzed by LC/TOF-MS after a systemic administration to rats. 京都大学, 2017, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20281>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	大 谷 祐 基
論文題目	Time-dependent structural alteration of rituximab analyzed by LC/TOF-MS after a systemic administration to rats (LC/TOF-MS を用いたラット生体内におけるリツキシマブの構造変化の解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>抗体医薬品は癌や自己免疫疾患などの領域において高い治療成績が認められているが、その効果発現には大きな個体間差があることが知られている。生物学的製剤である抗体医薬品は、抗体の製造段階で糖鎖構造の付加に代表される翻訳後修飾を受けるため、不均一な構造体の混合物となる。さらに、構造の不均一性は自身の薬理効果や薬物動態に影響を与える可能性が示唆されている。ゆえに、抗体医薬品の体内における構造変化を明らかにし、薬理効果との相関を評価することは治療効果や副作用の個体間差の解明につながる。本研究では、第一に生体内での抗体医薬品の構造解析手法の確立、第二に経時的な構造変化を評価することを目的とする。</p> <p>初めに、リツキシマブ製剤を用いて本手法の検証を行った。リツキシマブ製剤を パ パ イ ン 処 理 し て Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC/TOF-MS)解析を実施し、抗原認識部位を含む Fragment antigen binding (Fab)と糖鎖構造を含む reduced Fragment crystallizable (Fc/2)に相当するピークを検出した。Fab は理論値と同じ分子量が得られ、修飾等を受けていないことが示唆された。また、Fc/2 に該当するマススペクトルからは 8 種類のピークが検出され、修飾する糖鎖構造の違いに寄与することが分子量より推察された。また、この分析による正確度は 30 ppm 以内であり、得られた分子量は理論値と 1 Da 以内の誤差であった。次に、抗リツキシマブ抗体を用いてラットの血液よりリツキシマブを単離し、上述の方法で構造解析を実施した。マススペクトル上で Fab および Fc/2 のピークが検出され分子量も製剤と一致したため、抗リツキシマブ抗体による単離と LC/TOF-MS による分析という一連の方法によりラット体内のリツキシマブの構造解析が可能であると判断した。経時的な解析において、Fab の分子量はリツキシマブ投与 21 日後まで変化は見られず、アミノ酸への修飾等の変化がないことが判明した。一方で、Fc/2 の解析では製剤で検出されなかった GnGn を含め 9 種類の糖鎖付加体が検出された。各糖鎖付加体の相対含有率をマススペクトルのピーク高さを元に算出したところ、MGnF/GnAF および GnGnF では含有率の時間依存的な減少が、AAF および GnGn では増加がみられた。リツキシマブを血漿中に添加すると、in vivo と同様に糖鎖付加体の経時的な変化が観察されたことから、この変化は血漿中の酵素反応に起因することが示唆された。最後に、ラットより単離したリツキシマブについて、主な薬効とされる抗体依存性細胞傷害活性および補体依存性細胞傷害活性を in vitro の系で評価したが、これらの活性には経時的な変化が認められなかった。</p> <p>以上、LC/TOF-MS を用いた生体内リツキシマブの構造解析手法を確立した。さらに、生体内でリツキシマブに付加する糖鎖の含有率が経時的に変化することを明らかにした。本手法は、抗体医薬品の詳細な体内動態の解析を可能にし、治療効果や副作用における個体間差の解明に繋がるものとする。</p>			

<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>抗体医薬品は、製造段階で糖鎖構造の付加に代表される翻訳後修飾を受けるため、不均一な構造体の混合物である。構造の不均一性は薬理効果や薬物動態に影響を与えることが示唆されているが、生体内における抗体医薬品の構造変化に関する情報は乏しい。その理由はその解析法が確立されていないことによる。申請者は、生体内に存在する抗体医薬品の構造解析手法を確立して体内動態解析を行い、以下の新知見を得た。</p> <p>抗体医薬品をパパイン処理し、得られた断片を LC/TOF-MS により測定することで、分子量に基づいた抗体医薬品のアミノ酸及び糖鎖構造の解析を可能とした。リツキシマブ製剤の解析では、既報のように複数種の糖鎖が付加していることが判明し、本手法により 8 種の糖鎖付加体を同定した。さらに、血中から抗リツキシマブ抗体を用いてリツキシマブを単離し、ラット体内における経時的な構造変化を解析した。リツキシマブを構成するアミノ酸の変化は検出されなかったが、Fc 領域に付加している糖鎖の割合が経時的に変化することを見出した。また、この糖鎖の変化には、血漿中に存在する酵素が作用している可能性を示唆した。</p> <p>以上の研究は、抗体医薬品の詳細な体内動態の解明に貢献し、今後治療効果や副作用を予測する個別化療法の実現に大きく寄与するものである。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 2 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			